

( Translation )

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of  
the following application as filed with this Office.

Date of Application: May 17, 2000

Application Number: Japanese Patent Application  
No. 145099/2000

Applicant(s): Hitachi Software Engineering  
Co., Ltd.

April 20, 2001

Commissioner,  
Patent Office

Kozo OIKAWA (seal)

Certificate No. 2001-3033348

#1/2  
JC978 U.S. PTO

09/848771



日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

JC978 U.S. PTO  
09/848771  
05/03/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office

出願年月日  
Date of Application:

2000年 5月17日

出願番号  
Application Number:

特願2000-145099

出願人  
Applicant(s):

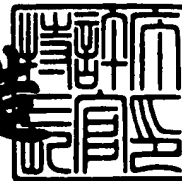
日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2001年 4月20日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3033348

【書類名】 特許願

【整理番号】 12A008

【提出日】 平成12年 5月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 バイオチップ作成溶液及びバイオチップ作成方法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

【氏名】 伊藤 敏明

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

【氏名】 山本 顕次

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

【氏名】 吉井 淳治

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町134 株式会社 デイーエヌエーチップ研究所内

【氏名】 辻本 敦美

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市泉区上飯田町313番3

【氏名】 奈須 永典

【特許出願人】

【識別番号】 000233055

【氏名又は名称】 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100102576

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 敏章

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9722155

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 バイオチップ作成溶液及びバイオチップ作成方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 生体高分子の入った第 1 の溶液と、前記第 1 の溶液と混合しない前記第 1 の溶液と比重の異なる第 2 の溶液とを含むことを特徴とするバイオチップ作成溶液。

【請求項 2】 生体高分子の入った第 1 の溶液と、前記第 1 の溶液と混合しない前記第 1 の溶液より比重の小さな第 2 の溶液とを含むことを特徴とするバイオチップ作成溶液。

【請求項 3】 生体高分子の入った第 1 の溶液と、前記第 1 の溶液と混合しない前記第 1 の溶液より比重の小さな第 2 の溶液と、前記第 1 の溶液と混合しない前記第 1 の溶液より比重の大きな第 3 の溶液とを含むことを特徴とするバイオチップ作成溶液。

【請求項 4】 インクジェット装置に生体高分子の入ったバイオチップ作成溶液を注入し、前記インクジェット装置からバイオチップ作成溶液を基板に噴射して基板上に生体高分子のスポットを固定化するバイオチップ作成方法において

前記バイオチップ作成溶液として請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載のバイオチップ作成溶液を用いることを特徴とするバイオチップ作成方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNA や蛋白質などの生体高分子を基板上に固定化したバイオチップの作成方法に関し、特にインクジェット方式でバイオチップを作成する方法及びそのときに用いるバイオチップ作成溶液に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

バイオチップは、DNA、蛋白質などの生体高分子をガラスプレートなどの基板上に固定化したものである。インクジェット方式でバイオチップを作成する方

法は、インクジェットプリンタに用いられるインクジェット装置にインクの代わりにバイオチップ作成用の生体高分子溶液（バイオチップ作成溶液）を入れ、バイオチップ作成溶液を基板上に噴射し、基板に生体高分子をスポットするものである。

#### 【0003】

バイオチップ作成溶液としては、図7に示すように、緩衝液12としてのTris-HCl、キレート剤13としてのEDTA、及びDNA14を混合して構成されたDNA溶液6が使用される。

#### 【0004】

図8は、圧電素子を用いたインクジェット装置によりバイオチップ作成手順を説明する断面図である。図8を用いて、インクジェット装置内におけるDNA溶液の状態について説明する。図8(a)は、インクジェット装置20のタンク1にバイオチップ作成溶液としてDNA溶液6を入れた初期状態を示す図である。DNA溶液6は、インクジェット装置20のタンク1及び供給路2に入っている。図8(b)はDNA溶液6をプレート5に噴射している状態を表している。圧電素子3に電圧を加えて供給路2を圧縮し、圧縮した圧力でDNA溶液6を噴射口4から噴射してプレート5にDNAスポット8を打ち、DNAを植付けている。その後、電圧素子3に印加する電圧を弱くして供給路2を圧縮状態から元の状態に戻す。この動作を次のプレートへと繰り返し行って複数個のバイオチップを作成する。

#### 【0005】

図8(c)は、溶液不足によるDNA溶液噴射の終了状態を示す図である。このとき、インクジェット装置20のタンク1と供給路2にはDNA溶液6が残っている。DNA溶液6が残っていても噴射することができないのは、インクジェット方式ではタンク1側に十分な量の溶液が入っていないと、供給路2を圧縮しても噴射口4側に噴射に必要な圧力が発生しないためである。その結果、タンク1と供給路2にDNA溶液6が残った状態で噴射が終了することになる。

#### 【0006】

【本発明が解決しようとする課題】

インクジェット装置を用いるバイオチップの作成では、上述のように、タンクに注入したバイオチップ作成溶液の全てをバイオチップ作成のために使いきることができない。つまり、インクジェット装置内にバイオチップ作成溶液が残った状態で終了するため、結果としてバイオチップ作成溶液を捨てることになる。よって、バイオチップの作成に当たっては基板に植付ける量と装置内に残る量を加算した合計量のバイオチップ作成溶液が必要であり、植付けに使用する以上のDNA溶液が必要となっている。例えば、DNAスポット0.2 n l（ナノリットル）のバイオチップを10000個作成するには、10000個分の2 μ l（マイクロリットル）とインクジェット装置内に残って捨てられる50 μ lの合わせて52 μ lのDNA溶液が必要とされる。このように、従来の方法ではバイオチップ作成のために用意した高価なDNA溶液の大部分が利用されずに捨てられることになり、バイオチップのコスト上昇要因となっている。これは、圧電素子を用いるインクジェット方式に限らず、ヒーター加熱で気泡を発生させて溶液を噴射するタイプのインクジェット方式、あるいは静電プロッタ方式など、DNA溶液を飛翔させて基板に付着させるすべてのタイプのバイオチップ作成装置に存在する問題である。

#### 【0007】

本発明は、このような従来技術の問題点に鑑み、高価なDNA等の生体高分子が入っているバイオチップ作成溶液を無駄なく利用することのできるインクジェット方式あるいは静電プロッタ方式によるバイオチップ作成方法を提供することを目的とする。また、本発明は、インクジェット方式あるいは静電プロッタ方式によってバイオチップを作成する際に使用して好適なバイオチップ作成溶液を提供することを目的とする。

#### 【0008】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明では、終了時にインクジェット方式や静電プロッタ方式のバイオチップ作成装置や内に残留する溶液を低コストのバッファ溶液とすることで前記目的を達成する。そのために、バイオチップ作成溶液を基板にスポットされるDNA等の生体高分子溶液と終了時に装置内に残るバッファ溶液とを組み合わせる構成す

る。バッファ溶液には、生体高分子溶液と比重が異なり生体高分子溶液と混ざらない溶液を用いる。

【0009】

生体高分子溶液とバッファ溶液とを組み合わせたものをバイオチップ作成溶液とすることで、バイオチップ作成装置に注入する生体高分子溶液の量を必要最小量に抑えることができる。例えば、従来インクジェット方式でバイオチップを10000個生産するのに必要なDNA溶液の量は基板にスポットされる2 $\mu$ lと装置内に残留する50 $\mu$ lの合わせて52 $\mu$ lであったが、本発明によると基板にスポットされる2 $\mu$ lだけでよく（装置内に残留する50 $\mu$ lはバッファ溶液で代替）、用意すべきDNA溶液の量を大幅に削減することが可能になる。従って高価なDNA溶液を捨てなくてすむため、大幅なコスト削減を達成できる。

【0010】

すなわち、本発明によるバイオチップ作成溶液は、生体高分子の入った第1の溶液と、第1の溶液と混合しない第1の溶液と比重の異なる第2の溶液とを含むことを特徴とする。

【0011】

本発明によるバイオチップ作成溶液は、生体高分子の入った第1の溶液と、第1の溶液と混合しない第1の溶液より比重の小さな第2の溶液とを含むことを特徴とする。

本発明によるバイオチップ作成溶液は、また、生体高分子の入った第1の溶液と、第1の溶液と混合しない第1の溶液より比重の小さな第2の溶液と、第1の溶液と混合しない第1の溶液より比重の大きな第3の溶液とを含むことを特徴とする。

【0012】

本発明によるバイオチップ作成方法は、インクジェット装置に生体高分子の入ったバイオチップ作成溶液を注入し、インクジェット装置からバイオチップ作成溶液を基板に噴射して基板上に生体高分子のスポットを固定化するバイオチップ作成方法において、バイオチップ作成溶液として前述した生体高分子の入った第1の溶液と、第1の溶液と混合しない第1の溶液と比重の異なる第2の溶液とを

含むバイオチップ作成溶液を用いることを特徴とする。

【0013】

生体高分子の入った溶液（例えばDNA溶液）と混合しない比重の異なるバッファ溶液は、溶液噴射側にDNA溶液が位置し、その後側にバッファ溶液が位置するように溶液の比重が選択される。例えば、上方から下方に向けて溶液を噴射する場合、DNA溶液より比重の軽いバッファ溶液を用い、DNA溶液の上にバッファ溶液が位置するようにする。逆に、下方から上方に向けて溶液を噴射する場合には、バッファ溶液の比重をDNA溶液より重くし、DNA溶液の下にバッファ溶液が位置するようにする。

【0014】

【発明の実施の形態】

以下、図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。

バイオチップはガラスなどのプレート（基板）上にDNAなどの生体高分子を植付けたものであり、インクジェット方式のバイオチップの作成システムは生体高分子をプレート上に植付けるインクジェット装置と、生体高分子が入っているバイオチップ作成溶液を使用する。以下では、説明を簡単にするために生体高分子としてDNAを用いた場合について説明する。

【0015】

図1は、本発明によるバイオチップ作成方法を実行するための装置構成図である。インクジェット装置20にインクの代わりにバイオチップ作成溶液11を入れて噴射し、プレート5の表面にDNAスポット8を形成し、バイオチップ9を作成する。この原理は従来法と同様である。インクジェット装置20のタンク1にバイオチップ作成溶液11を注入し、供給路2を通して噴射口4までバイオチップ作成溶液11を満たす。このとき、バイオチップ作成溶液11は、インクジェット装置20のタンク1及び供給路2に入っている。次に、供給路2に設けられた電圧素子3で供給路2に圧力をかけて圧縮し、噴射口4からバイオチップ作成溶液を噴射させ、プレート5にDNAスポット8を打つ。こうして、バイオチップ9が作成される。

【0016】

## 〔実施の形態 1〕

図 2 に、本発明によるバイオチップ作成溶液の構成例を示す。このバイオチップ作成溶液は、DNA 溶液 6 とバッファ溶液 7 とから構成されている。DNA 溶液 6 は、緩衝液としての  $\text{Tris-HCl}$  と、キレート剤としての  $\text{EDTA}$  と、プレートにスポットすべき DNA とで構成されている。バッファ溶液 7 としては、DNA 溶液 6（比重約 1.0）より比重の軽い流動パラフィン（比重 0.83～0.86）またはミネラルオイル（比重 0.84～0.88）を用い、DNA 溶液 6 と混ざらないようにした。

## 【0017】

図 3 は、図 2 のバイオチップ作成溶液を用いたインクジェット方式によるバイオチップ作成方法を説明する図である。

図 3（a）は、インクジェット装置 20 のタンク 1 に図 2 のバイオチップ作成溶液を注入した初期の状態を表す図である。比重の異なる相互に混じり合わない 2 種類の溶液 6，7 で構成されたバイオチップ作成溶液は、DNA 溶液 6 とバッファ溶液 7 とが分離した状態となっている。このとき、バイオチップ作成溶液を別の容器で調製してタンク 1 へ一括注入するより、タンク 1 への注入は比重の重い順に、DNA 溶液 6、バッファ溶液 7 と順に注入する方が望ましい。これは、タンク 1 へ注入するとき、各溶液ができるだけ混ざらないようにするためである。

## 【0018】

図 3（b）は、バイオチップを作成している状態を示す模式図である。プレート 5 をインクジェット装置 20 の噴射口 4 の下に位置づけ、DNA 溶液 6 を噴射してプレート 5 に DNA を植付ける。DNA 溶液 6 はバッファ溶液 7 より比重が重いため噴射口 4 側に位置し、バッファ溶液 7 はタンク 1 側に分離して位置している。そのため、DNA 溶液 6 を先に使用することができる。

## 【0019】

DNA 溶液 6 の噴射に当たっては、圧電素子 3 に電圧を印加して供給路 2 を圧縮する。供給路 2 には圧電素子 3 の位置を中心にタンク 1 側と噴射口 4 側に圧力が発生するが、タンク 1 側の圧力を噴射口 4 側の圧力より大きく保っておけば、

圧力の弱い方に力が移動するため、噴射口4からDNA溶液6を噴射することができる。その後、圧電素子3への印加電圧を低下させ、供給路2の圧縮を元の状態にする。すると圧縮解除による吸引力が発生し、圧力の大きい方のタンク1から供給路2にDNA溶液6を供給することができる。バイオチップを複数個作成するときは、DNA溶液6を打ち付けたあと、プレート5を送り出し、次のプレート5を噴射口4の下に移動させる。これを繰り返して行えば複数のバイオチップを作成することができる。

## 【0020】

図3(c)は、DNA溶液6を全て使い終わった状態を示している。このとき、インクジェット装置20の供給路2とタンク1にはバッファ溶液7が残る。これにより、DNA溶液6を無駄にすることなく全てプレートに植付けることができる。

## 【0021】

## 〔実施の形態2〕

図4に、本発明によるバイオチップ作成溶液の他の構成例を示す。このバイオチップ作成溶液は、インクジェット装置の初期調整で、噴射動作が安定するまで試し噴射を必要とする場合に有効な溶液である。

## 【0022】

バイオチップ作成溶液は、DNA溶液6とバッファ溶液7と初期調整液10とで構成されている。DNA溶液6は、緩衝液としてのTris-HClと、キレート剤としてのEDTAと、プレートにスポットすべきDNAとで構成されている。バッファ溶液7としては、DNA溶液6(約1.0)より比重の軽い流動パラフィン(比重0.83~0.86)またはミネラルオイル(比重0.84~0.88)を使用する。初期調整液10としては、DNA溶液6より比重の重いグリセロール(比重約1.26)またはクロロホルム(約1.48)を使用する。

## 【0023】

図5は、図4に示したバイオチップ作成溶液を用いたインクジェット方式のバイオチップ作成方法を説明する図である。

図5(a)は、インクジェット装置20のタンク1に図4に示したバイオチッ

ブ作成溶液を注入した初期の状態を示す図である。比重の異なる相互に混合しない3種類の溶液10, 6, 7で構成されたバイオチップ作成溶液は互いに分離した状態となっている。各溶液は比重の重い順に供給路2を満たし、一番比重の軽いバッファ溶液7がバイオチップ作成溶液の上部に浮いた状態となっている。すなわち、供給路2の噴射口4の近くは初期調整液10を満たし、その上にDNA溶液6が位置し、さらにその上にバッファ液7が位置する。インクジェット装置にバイオチップ作成溶液を注入するときは、別の容器で調製したバイオチップ作成溶液をタンク1へ一括注入するより、初期調整液10、DNA溶液6、バッファ溶液7と比重の重い順にタンク1に順番に注入する方が望ましい。これは、タンク1へ注入するとき各溶液ができるだけ混ざらないようにするためである。

## 【0024】

図5(b)は、インクジェット装置の噴射動作が安定するまでの初期調整状態を示す図である。噴射量が安定になるまで溶液の噴射動作をくり返し行う。このとき、噴射口4から噴射される溶液は初期調整液10であり、DNA溶液6を使用しなくてすむ。

## 【0025】

図5(c)は、初期調整の後、バイオチップを作成している状態を示す模式図である。バイオチップ作成のための溶液噴射は、初期調整液10を完全に噴射し終わり、DNA溶液6が噴射口4から噴射するようになった後で、プレート5をインクジェット装置20の噴射口4の下に位置づけ、DNA溶液6を噴射することで行う。DNA溶液6はバッファ溶液7より比重が重いので噴射口4側に位置し、バッファ溶液7はタンク1側に分離して位置している。そのため、DNA溶液6をバッファ溶液7より先に使用することができる。

## 【0026】

図5(d)は、DNA溶液6を全て使い終わった状態を示している。このとき、インクジェット装置20の供給路2とタンク1にはバッファ溶液7が残る。これにより、DNA溶液6を無駄にインクジェット装置内に残すことなく全てプレート5に植付けることができる。

## 【0027】

## 〔実施の形態 3〕

図 6 は、図 2 のバイオチップ作成溶液を用いた静電プロッタ方式によるバイオチップ作成方法を説明する図である。

静電プロッタ方式のバイオチップ作成装置は、マイナス極側の放電ピン 2 2 を装着したタンク 2 1 と、プラス極プレート 2 3 とで構成される。DNA 溶液 6 とバッファ溶液 7 からなるバイオチップ作成溶液をタンク 2 1 に入れ、プラス極プレート 2 3 の上にプレート 5 を置く。比重の重い DNA 溶液 6 はタンク 1 内で下方のノズル 2 4 側に位置し、比重の軽いバッファ液 7 は DNA 溶液 6 の上部に分離して位置する。

## 【0028】

プレート 5 に DNA 溶液を付着させる時は、マイナス極側の放電ピン 2 2 とプラス極プレート 2 3 の間に直流の電圧を印加する。すると、マイナス極側の放電ピン 2 2 からプラス極プレート 2 3 に向かって静電気が生じ、静電力によって DNA 溶液がノズル 2 4 からプラス極プレート 2 3 の方向に飛ぶ。こうすることで、プレート 5 に DNA 溶液を付着させることができる。この静電プロッタ方式によるバイオチップ作成方法においても、従来法に比較して DNA 溶液 6 の有効利用が可能になる。

## 【0029】

以上説明したように、本発明によるバイオチップ作成溶液を用いると、高価な DNA が入っている DNA 溶液を捨てることなく、全てバイオチップに植付けることができる。ここでは、生体高分子として DNA を用いた場合のバイオチップ作成溶液について説明した。しかし、本発明は蛋白質チップの作成など、DNA 以外の生体高分子を固定化したバイオチップの作成に適用できることはもちろんのこと、インクジェット方式や静電プロッタ方式に限らず生体高分子を溶液に媒体へ付着させてバイオチップを作成する全ての方式に適用できる。

## 【0030】

## 【発明の効果】

本発明によると、インクジェット方式や静電プロッタ方式など、DNA を植付ける方式において、高価な DNA が入っている DNA 溶液を無駄にすることなく

有効に使用してバイオチップを作成することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明によるバイオチップ作成方法を実行するための装置構成図。

【図 2】

本発明によるバイオチップ作成溶液の構成例を示す図。

【図 3】

図 2 のバイオチップ作成溶液を用いたインクジェット方式によるバイオチップ作成方法の説明図。

【図 4】

本発明によるバイオチップ作成溶液の他の構成例を示す図。

【図 5】

図 4 に示したバイオチップ作成溶液を用いたインクジェット方式によるバイオチップ作成方法の説明図。

【図 6】

図 2 のバイオチップ作成溶液を用いた静電プロッタ方式によるバイオチップ作成方法の説明図。

【図 7】

バイオチップ作成溶液の説明図。

【図 8】

従来のバイオチップ作成手順を説明する図。

【符号の説明】

- 1 : タンク
- 2 : 供給路
- 3 : 電圧素子
- 4 : 噴射口 (ノズル)
- 5 : プレート
- 6 : DNA 溶液
- 7 : バッファ溶液

DNA スポット

9 : バイオチップ

1 0 : 初期調整液

1 1 : バイオチップ作成溶液

1 2 : 緩衝液

1 3 : キレート剤

1 4 : DNA

2 0 : インクジェット装置

2 1 : タンク

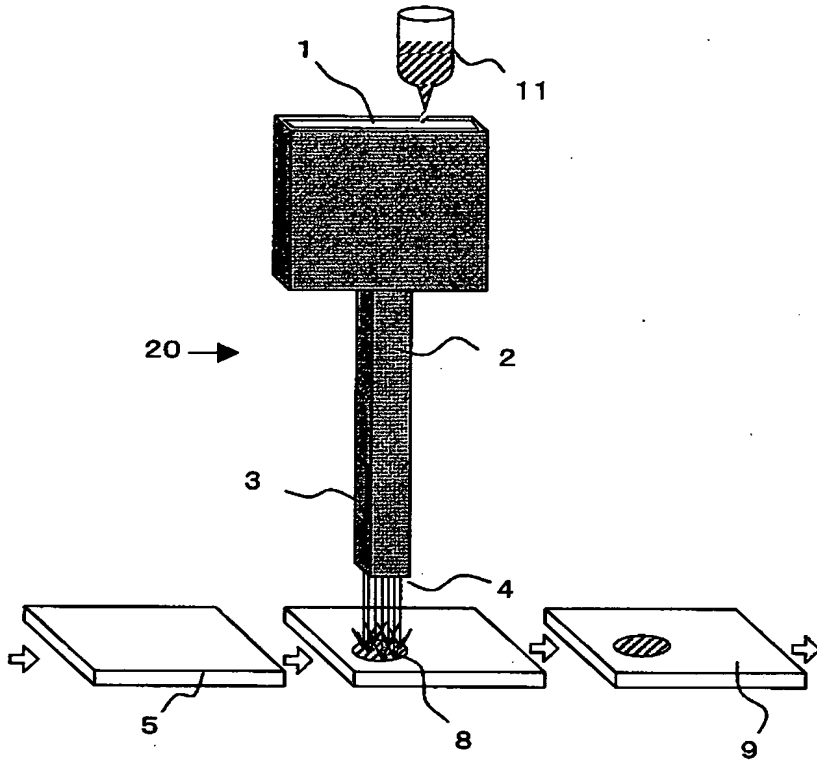
2 2 : マイナス極側放電ピン

2 3 : プラス極プレート

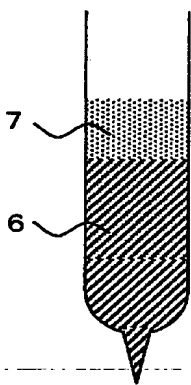
2 4 : ノズル

書類名】 図面

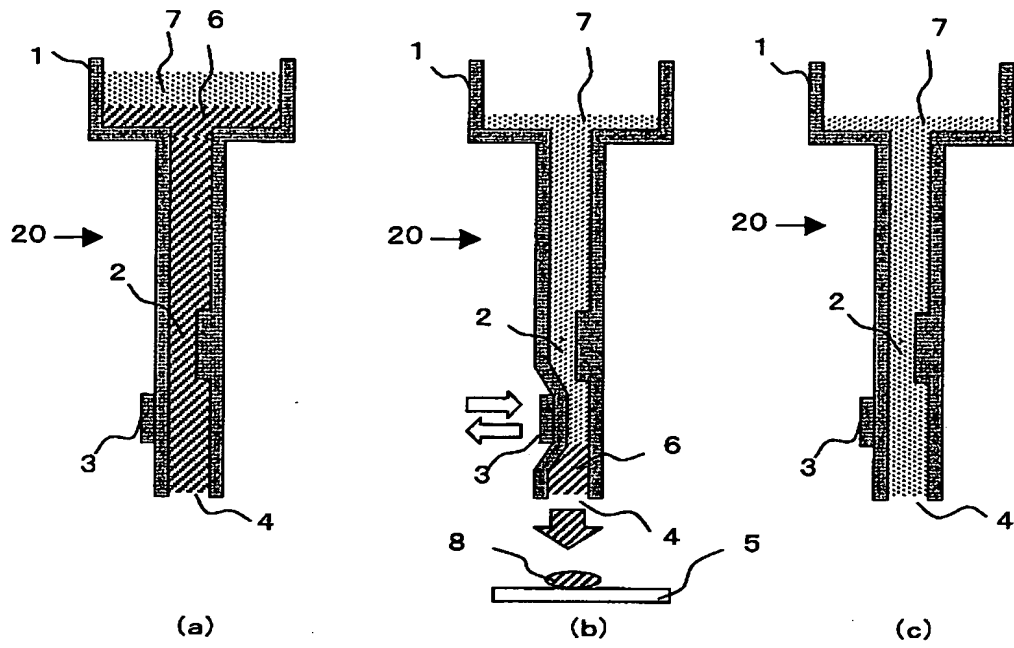
【図 1】



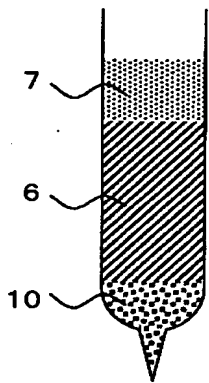
【図 2】



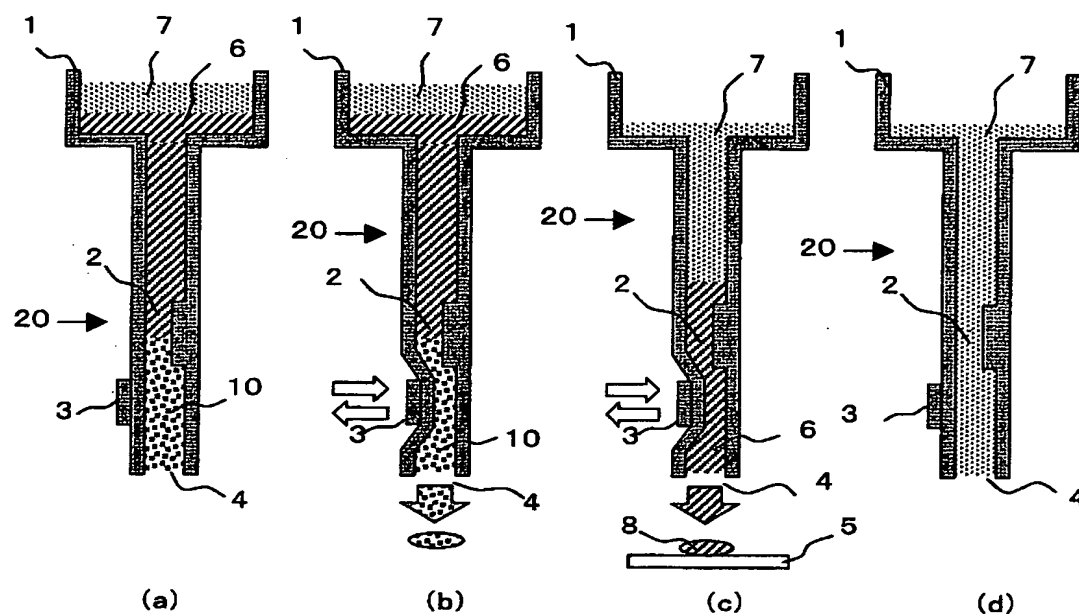
【図 3】



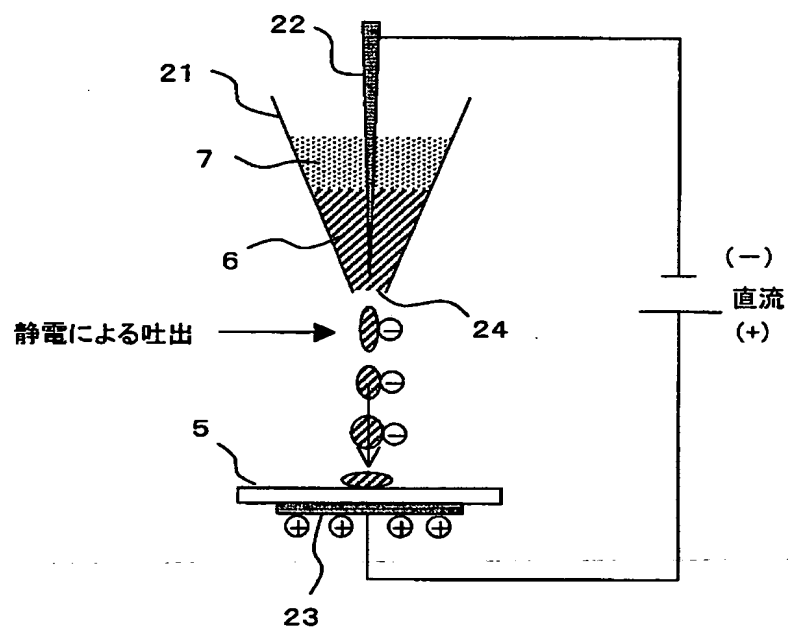
【図 4】



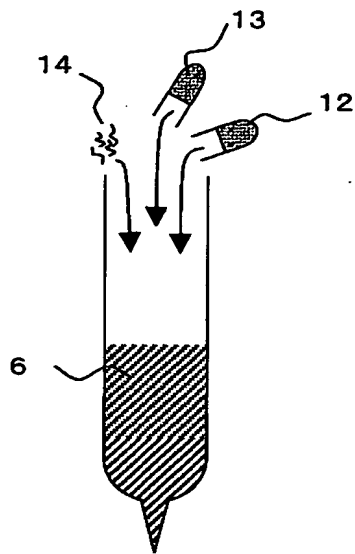
【図 5】



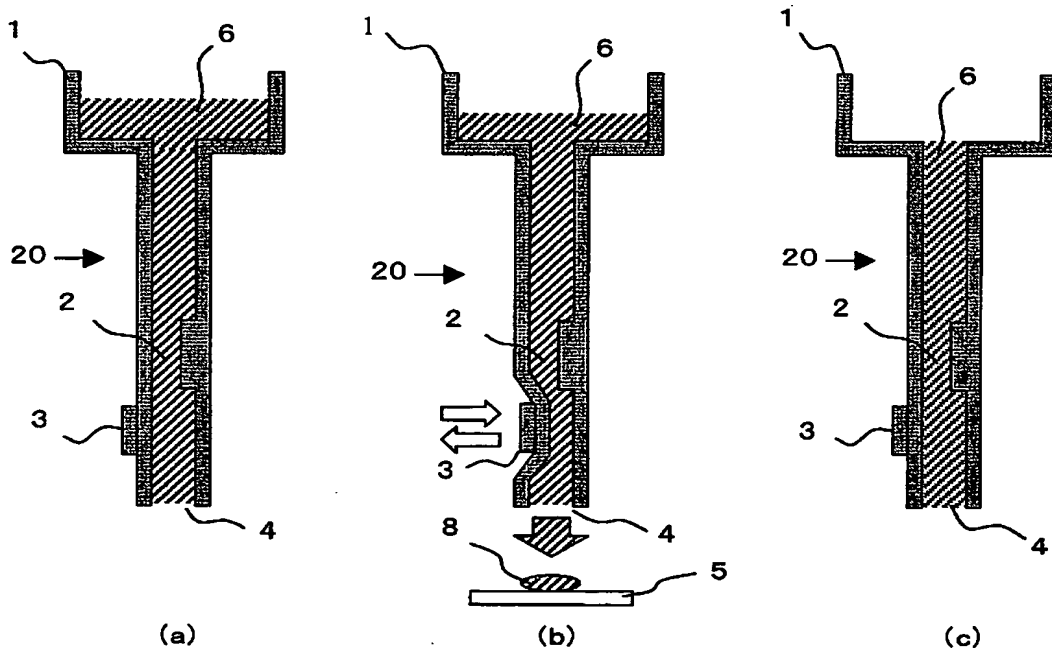
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 インクジェット方式でバイオチップを作成する際、DNA溶液を無駄なく使用する。

【解決手段】 バイオチップ作成溶液を、プレート5にスポットするDNA溶液6と終了時に装置内に残るバッファ溶液7とを組み合わせた溶液で構成し、終了時に残る溶液を低コストのバッファ溶液7とする。バッファ溶液7はDNA溶液6と混ざらないようにするため、DNA溶液6と比重の異なるものを使用する。

【選択図】 図3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000233055]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地  
氏 名 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社